

УДК 581.1

ПРОГНОЗ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ПО СОДЕРЖАНИЮ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ И ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ УПРОЩЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ ЕЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ

© 2011 С.Ю. Веселов, Г.В. Шарипова, М.Д. Тимергалин, Д.С. Веселов, Г.Р. Кудоярова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 30.06.2011

Изучалась засухоустойчивость растений пяти сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), районированных в Республике Башкортостан. В задачи данной работы входило изучение связи содержания абсцизовой кислоты (АБК) с устойчивостью сортов мягкой пшеницы к условиям умеренной засухи и оценка возможности сокращения процедуры очистки экстракта перед проведением иммуноанализа. Полученные данные свидетельствуют о том, что при селекции растений пшеницы, устойчивых к условиям умеренной засухи следует учитывать уровень АБК в листьях. Была предпринята попытка упростить процедуру экстракции АБК перед иммуноанализом этого гормона с помощью специфических антител. На основе полученных результатов сделан вывод о том, что только метилированный вторичный эфирный водный экстракт может быть использован для оценки засухоустойчивости растений по содержанию АБК в листьях растений.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, засухоустойчивость, АБК, иммуноанализ.

Засуха – одна из основных причин снижения урожайности растений [3]. Поэтому повышение засухоустойчивости – основной резерв для удовлетворения потребностей растущего населения земного шара в продуктах питания [16]. С точки зрения агрономии засухоустойчивость – это не выживание растений в условиях засухи, а способность сохранять относительно высокий уровень урожайности в условиях дефицита воды [15]. До сих пор валовой сбор сельскохозяйственной продукции увеличивался за счет расширения посевных площадей и роста урожайности растений в благоприятных условиях, но этот резерв близок к истощению [16]. «Зеленая революция» не затронула растения засушливых регионов, но успехи, достигнутые селекционерами в отдельных странах с засушливым климатом, свидетельствуют о том, что прогресс в этой области возможен. Так, в Мексике путем целенаправленной селекции засухоустойчивых растений были выведены сорта кукурузы, урожайность которых в несколько раз превосходила старые сорта [7].

Отбор засухоустойчивых сортов ведется по урожайности растений в условиях засухи [12]. Этот подход требует многолетних испытаний, поскольку во многих регионах засуха нерегулярна. Проблема состоит в том, что селекционный процесс требует отбраковки растений по результатам одного года испытаний. Использование физиологических признаков, наряду с селекцией по урожайности может позволить вести отбор в отсутствие засухи. Поэтому проводятся многочисленные исследования возможности отбора засухоустойчивых растений по физиологическим признакам [4, 8, 9, 12, 13].

Оценка уровня абсцизовой кислоты (АБК) в растениях является одним из перспективных подходов. Этот фитогормон накапливается в растениях при дефиците воды и запускает ряд процессов, направленных как на ограничение испарения воды листьями за счет уменьшения их площади и закрытия устьиц [6], так и повышение устойчивости растений к обезвоживанию (запуск антиоксидантных систем, синтез осмопротекторов и т.д. [2]). Поэтому продолжают исследоваться возможности использования оценки уровня АБК в растениях для прогноза засухоустойчивости растений [8, 11]. Вместе с тем, до сих пор нет определенного мнения о том, в каком направлении нужно вести отбор: следует ли отбирать растения с высоким или низким уровнем содержания АБК. Эта неопределенность может быть связана с тем, что при различных уровнях засухи устойчивость к ней формируется за счет различных механизмов. При слабой засухе более важна не способность растений экономить воду за счет закрытия устьиц (механизм, контролируемый абсцизовой кислотой), а способность более эффективно поглощать воду [4]. Устойчивость к мягкой засухе очень важна, поскольку именно в этих условиях возможно получение относительно высоких урожаев. Однако при оценке уровня АБК у разных сортов растений чаще всего моделировали сильную засуху, искусственно вызывая быстрое подсушивание листьев растений [11]. В задачу данной работы входила оценка уровня АБК при моделировании мягкой засухи за счет повышения температуры и снижения влажности воздуха. Данные по содержанию АБК в листьях растений разных сортов сопоставляли с урожайностью растений в условиях мягкой засухи 2009 г. в Южном Предуралье.

Возможность использования уровня АБК для отбора устойчивых к засухе растений зависит также от того, насколько прост метод ее определения. Иммуноанализ гормонов растений и, в том числе, АБК – перспективный подход, поскольку процесс определения с помощью антител к гормону занимает всего несколько часов, а необходимое оборудование (анализатор иммуноферментный Униплан, «Пикон», Мо-

Веселов Станислав Юрьевич, докт. биол. наук, проф., e-mail: respectableman@yandex.ru; *Шарипова Гузель Вакильевна*, канд. биол. наук, e-mail: g.v.sharipova@mail.ru; *Тимергалин Максим Данилович*, e-mail: timermax@mail.ru; *Веселов Дмитрий Станиславович*, докт. биол. наук, e-mail: veselov@anrb.ru; *Кудоярова Гузель Радомесовна*, докт. биол. наук, проф., e-mail: guzel@anrb.ru

сква) производится в России и стоит относительно недорого. Вместе с тем, для определения АБК с помощью иммуноанализа необходима предварительная очистка экстракта. Ее целью является освобождение образцов от иммунореактивных производных АБК (ее глюкозидов и эфиров). Поскольку эта процедура удлиняет продолжительность определения, важно проверить возможность использования определения суммарного содержания как свободной АБК, так и ее производных в неочищенном экстракте. Таким образом, в задачи данной работы входило изучение связи содержания АБК с устойчивостью сортов мягкой пшеницы к условиям умеренной засухи и оценка возможности сокращения процедуры очистки экстракта перед проведением иммуноанализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Засухоустойчивость растений пяти сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), районированных в РБ, оценивали по урожайности в условиях умеренной засухи 2009 г. (0,75 гидротермический коэффициент) на опытных полях БашНИИСХ. Семена раскладывали для прорастания на плотки (связанные вместе полые запаянные стеклянные трубки) и переносили в кювету с водопроводной водой. Семена проращивали в темноте при температуре 24°C. Через 2 сут кювету переносили на светоплощадку (освещенность 18 кЛк, продолжительность светового периода 14 ч, температура 30°C, ОВВ 40%), а через сутки растения переносили в кювету с 10%-ной питательной средой Хогланда-Арнона 1. Низкая влажность воздуха и относительно высокая температура были выбраны для имитации условий умеренной засухи.

Содержание АБК определяли в листьях 7-суточных проростков (начало выхода второго листа). Листья 10 растений взвешивали и растирали в 80%-ном этиловом спирте (соотношение веса листьев к объему экстрагента – 1:10). Экстракцию проводили в течение ночи в холодильнике при 4°C, затем экстракт центрифугировали и надосадочную жидкость упаривали в чашках Петри под струей воздуха до водного остатка (полноту удаления спирта контролировали по запаху). Аликвоту водного остатка, содержащую свободную АБК, ее глюкозиды и нейтральные эфиры (2 мл из 6) оставляли для проведения иммуноанализа. Оставшийся водный остаток делили пополам (по 2 мл) и после разбавления дистиллированной водой до 9 мл каждого варианта и подкисления до pH 2-3 экстрагировали АБК диэтиловым эфиром дважды (соотношение водной и органической фазы 3:1). Первичный эфирный экстракт (5 мл) первого варианта оставляли для иммуноанализа, а слабые кислоты из второго варианта переводили в водный раствор (1% NaHCO₃) (соотношение водной и органической фазы 1:2). Затем подкисляли раствор соды до pH 2-3. АБК экстрагировали диэтиловым эфиром (соотношение водной и органической фазы 2:1), и полученный таким образом вторичный эфирный экстракт метилировали диазометаном. Диазометан готовили из нитрозометилмочевины (к 40%-ному раствору охлажденной гидроокиси калия, перемешивая на

мешалке, добавляли диэтиловый эфир в соотношении 1:3 и нитрозометилмочевину до образования устойчивой желтой окраски). В пробирки с 3 мл вторичного эфирного экстракта добавляли по 5 мл раствора диазометана. Упаренные образцы первичного эфирного экстракта и метилированного вторичного экстракта растворяли в 50 мкл 70%-ного спирта и добавляли по 10 мкл в сенсбилизированные лунки планшета («Corning», США). Иммуноферментный анализ проводили в лунках полистиролового планшета. На первом этапе конъюгат гормона с белком сорбировали на твердой фазе (полистирол) и выдерживали в течение 1.5 ч при 37°C. После 3-кратной промывки физиологическим раствором, содержащим 0.05% поверхностно активного вещества Tween-20 (ФТ) pH 6.8–7.0, в лунки вносили антисыворотку к гормону вместе с раствором стандарта гормона или растительным экстрактом. Инкубировали при 37°C в течение 1 ч, затем промывали лунки раствором ФТ. Для определения количества сыворотки, прореагировавшей с сорбированными в лунках белковыми конъюгатами гормонов, использовали препарат антикроличьих бараньих антител, меченных пероксидазой. Планшеты с этим препаратом инкубировали 1 ч при 37°C, после окончания инкубации промывали ФТ. Количество иммуносорбированных антител определяли по цветной реакции субстрата (0.4 мг/мл ортофенилендиамина в 0.06 М фосфатном буфере pH 5.0, содержащем 0.006% пероксида водорода). Цветная реакция развивалась в течение 15-30 мин, затем ее останавливали 4 н H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли на иммуноферментном анализаторе (Униплан, «Пикон», Москва) при длине волны 492 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление связи между содержанием АБК в листьях и засухоустойчивостью растений пшеницы. На рисунке приведены данные по содержанию АБК в побегах растений, выращенных в лаборатории, и урожайности в условиях умеренной засухи в Южном Предуралье в 2009 г. В этих условиях наиболее урожайным был сорт Омская 35, наименее – Казахстанская 10. По этому признаку образовался следующий ряд: Омская 36>Симбирка>Башкирская 26. У растений этих 5 сортов мягкой пшеницы, выращенных в лаборатории при повышенной дневной температуре (30°C) и пониженной влажности (40%) определяли содержание АБК в листьях. Минимальный уровень гормона был выявлен у растений сорта Омская 35, максимальный – у Казахстанской 10. Остальные сорта по содержанию АБК в листе располагались в порядке Омская 36<Симбирка<Башкирская 26. Легко заметить, что между содержанием АБК в лабораторных условиях и урожайностью растений прослеживалась четкая отрицательная корреляция ($r=-0,99$). Наибольшая урожайность была у сорта с минимальным содержанием АБК, а по мере возрастания уровня АБК урожайность снижалась.

Хорошо известно, что нарушение водного баланса является стимулом для накопления АБК [5]. Поэтому ее повышенное содержание может быть индикатором способности поддерживать водный обмен при дефиците воды, вызванным в лабораторных условиях

повышенной температурой и пониженной влажностью воздуха. Важно, что эти выявленные в лабораторных условиях свойства растений, судя по их корреляции с продуктивностью в полевых условиях, по-

зволяли оценить потенциальную засухоустойчивость растений. Полевые испытания имеют ряд недостатков, что делает привлекательной возможность лабораторной диагностики засухоустойчивости.

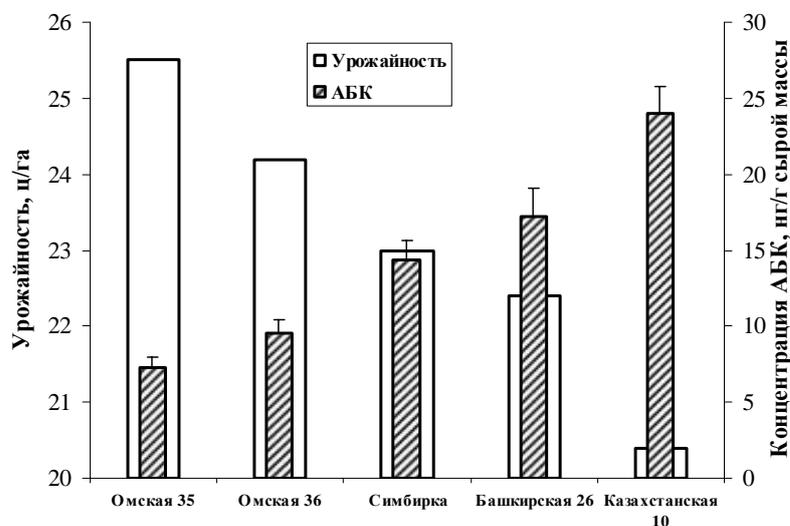


Рис. Содержание АБК в побегах растений, выращенных в лаборатории, и их урожайность в условиях умеренной засухи в Южном Предуралье в 2009 г. На графике представлены средние значения 3 биологических и 9 химических повторностей и их стандартные отклонения.

Накопление АБК способствует закрытию устьиц, что обеспечивает экономное расходование воды в условиях сильной засухи [10]. Вместе с тем, закрытие устьиц приводит к нарушению газообмена и фотосинтеза.

Было показано, что в условиях умеренной засухи важнее не способность закрывать устьица, а, наоборот, поддерживать их открытыми за счет эффективного поглощения воды [4]. У растений, способных поглощать достаточное количество воды, необходимой для формирования урожая в условиях ее умеренного дефицита, уровень АБК должен быть меньше, что соответствует полученным нами данным. Наши данные свидетельствуют о том, что при селекции растений пшеницы, устойчивых к условиям умеренной засухи, следует учитывать уровень АБК в листьях (отбирать растения с более низким уровнем АБК в условиях умеренного дефицита воды).

Изучение возможности упрощения процедуры очистки экстракта перед определением АБК с помощью иммуноанализа. Была предпринята попытка упростить процедуру экстракции АБК перед иммуноанализом этого гормона с помощью специфических антител.

В таблице представлены результаты измерения содержания АБК и ее производных в водном остатке спиртового экстракта, первичном и вторичном метилированном эфирном экстракте из листьев пяти сортов растений пшеницы (табл.).

Из таблицы видно, что в водном остатке было выявлено более высокое содержание веществ, способных реагировать с сывороткой к абсцизовой кислоте по сравнению с вторичным метилированным экстрактом.

Эти результаты соответствуют данным о том, что в водном остатке наряду со свободной АБК содержатся

ее глюкозиды и нейтральные эфиры, в то время как иммунореактивность вторичного метилированного экстракта соответствует содержанию свободной АБК [1].

Выявлена слабая отрицательная корреляция между содержанием свободной АБК в метилированном вторичном эфирном экстракте и водном остатке ($r=-0,24$).

Таблица. Концентрация АБК (нг/мл) в листьях растений мягкой пшеницы с использованием разных процедур очистки экстракта перед определением гормона

Сорт	Фракция № 1	Фракция № 2	Фракция № 3
Казахстанская 10	26,7±8,1	74,4±7,8	24±5,2
Башкирская 26	21,9±4,8	91,2±10,8	17,2±5,6
Симбирка	71,2±14,3	96,1±10,8	14,4±3,9
Омская 36	50,1±6,7	105,2±17,2	9,5±2,6
Омская 35	26,9±5	71,3±7,2	7,3±2,1

Прим. Фракция № 1 – водный остаток спиртового экстракта, фракция № 2 – первичный эфирный экстракт, фракция № 3 – вторичный метилированный эфирный экстракт. В таблице представлены средние значения 3 биологических и 9 химических повторностей и их стандартные отклонения

В листьях сортов Казахстанская 10 и Башкирская 26 суммарное содержание производных АБК в водном остатке было самым низким из изученных сортов, в то время как уровень свободной АБК в метилированном экстракте был самым высоким. Этот эффект может быть связан с тем, что связанные формы АБК (глюкозиды) являются ее запасной формой, из которой в условиях стресса освобождается ак-

тивная форма [14]. У растений сортов Казахстанская 10 и Башкирская 26 разница между показателями в водном остатке и метилированном экстракте была минимальной, что указывает на низкое содержание связанных форм АБК в листьях этих растений.

Полученные нами результаты указывают на то, что относительно высокое содержание свободной АБК в листьях растений этих сортов могло быть следствием ее освобождения из связанной формы. Так или иначе, суммарное содержание иммунореактивных по отношению к антителам к АБК соединений в водном остатке спиртового экстракта адекватно не отражает содержания свободной АБК в листьях и не может быть критерием для оценки засухоустойчивости растений пшеницы. Уровень иммунореактивности первичного эфирного экстракта был выше показателей водного остатка спиртового экстракта, что указывает на присутствие в нем interfering соединений, мешающих определению [1]. Выявление природы этих interfering компонентов не входило в задачу данной работы. Для решения поставленной перед нами задачи важно, что показатели иммунореактивности первичного эфирного экстракта не соответствовали уровню содержания свободной АБК, выявляемой во вторичном эфирном экстракте после его метилирования. Таким образом, проделанная нами работа позволяет сделать вывод о том, что только метилированный вторичный эфирный водный экстракт может быть использован для оценки засухоустойчивости по содержанию АБК в листьях растений.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при селекции растений пшеницы, устойчивых к условиям умеренной засухи, следует учитывать уровень АБК в листьях.

На основе полученных результатов можно также сделать вывод о том, что только метилированный вторичный эфирный водный экстракт может быть использован для оценки засухоустойчивости по содержанию АБК в листьях растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Veselov S. Yu.* Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Уфа: Изд. БашГУ, 1998. 138 с.
2. *Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
3. *Chaves M.M., Oliveira M.M.* Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 55. P. 2365-2384.
4. *Collins N.C., Tardieu F., Tuberosa R.* Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? // *Plant Physiology.* 2008. V. 147. P. 469-486.
5. *Creelman R.A., Mullet E.* Abscisic acid accumulates at positive turgor potential in excised soybean seedling growing zones // *Plant Physiology.* 1991. V. 95. P. 1209-1213.
6. *Davies W.J., Kudoyarova G.R., Hartung W.* Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought // *J. Plant Growth Regulation.* 2005. V. 24. P. 285-295.
7. *Edmeades G.O., Bolanos J., Chapman S.C. et al.* Selection improves drought tolerance in tropical maize populations // *Gains in Biomass, Grain Yield, and Harvest Index Crop Sci.* 1999. V. 39. P. 1306-1315.
8. *Landi P., Sanguineti M.C., Liu C. et al.* Root-ABA1 QTL affects root lodging, grain yield, and other agronomic traits in maize grown under well-watered and water-stressed conditions // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 319-326.
9. *Lee E.A., Tollenaar M.* Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield // *Crop Sci.* 2007. V. 47. № 3. P. 202-215.
10. *Morison J.L.L., Baker N.R., Mullineaux P.M., Davies W.J.* Improving water use in crop production // *Phil. Trans. R. Soc.* 2008. V. 363. P. 639-658.
11. *Quarrie S.A.* Implications of genetic differences in ABA accumulation for crop production // *Abscisic acid: physiology and biochemistry.* Oxford: Bios Scientific Publ., 1991. P. 227-243.
12. *Quarrie S.A., Stojanovic J., Pekic S.* Improving drought resistance in small-grained cereals: a case study, progress and prospects // *J. Plant Growth Regul.* 1999. V. 29. P. 1-21.
13. *Reynolds M., Dreccer F., Trethowan R.* Drought adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 177-186.
14. *Sauter A., Dietz K.J., Hartung W.* A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signaling // *Plant Cell Environ.* 2002. V. 25. P. 223-228.
15. *Tardieu F.* Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress // *Comp. Rend. Geosci.* 2005. V. 337. P. 57-67.
16. *Tester M., Langridge P.* Breeding technologies to increase crop production in a changing world // *Science.* 2010. V. 327. P. 818-822.

ESTIMATION OF DROUGHT RESISTANCE BY DETERMINATION OF ABA LEVEL AND INVESTIGATION OF ITS ASSAY PROCEDURE SIMPLIFICATION IN WHEAT PLANTS

© 2011 S.Yu. Veselov, G.V. Sharipova, M.D. Timergalin, D.S. Veselov, G.R. Kudoyarova

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

Drought resistance of 5 varieties of bread wheat plants cultivated in Bashkiriya was investigated. We planned to determine the connection of ABA content with drought resistance of bread wheat plants and estimated possibility of assay procedure simplification. We postulated that we need knowledge of ABA level in case of selection under drought conditions. The methylated secondary ester extract only can be used for ABA determination.

Key words: *Triticum aestivum*, drought resistant, ABA, immunoassay.

Veselov Stanislav Yurievich, Doctor of Biology, Professor, e-mail: respectableman@yandex.ru; *Sharipova Guzel Vakilievna*, Candidate of Biology, g.v.sharipova@mail.ru; *Timergalin Maksim Danilovich*, timermax@mail.ru; *Veselov Dmitriy Stanislavovich*, Doctor of Biology, e-mail: veselov@anrb.ru; *Kudoyarova Guzel Radomesovna*, Doctor of Biology, Professor, e-mail: guzel@anrb.ru